

**CYTOLYSIS OF ACID-FAST BACTERIA AND EXTRACTION OF NUCLEIC ACID**

**Patent number:** JP10304869  
**Publication date:** 1998-11-17  
**Inventor:** USUI MITSUGI; HAKII CHIKAKO; KANEJIMA TOSHIHITO; ASAII YOSHIYUKI  
**Applicant:** SANKO JUNYAKU KK  
**Classification:**  
- international: C12N1/06; C07H21/00; C12N15/09  
- european:  
**Application number:** JP19970117161 19970507  
**Priority number(s):**  
( )

**Abstract of JP10304869**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To decompose a lipid existing in the cell wall of acid-fast bacteria and lyse the cell by treating acid-fast bacteria with an enzymatic agent having lipid-cleaving activity and protein-decomposition activity.

**SOLUTION:** An acid-fast bacterium is treated with an enzymatic agent having lipid-cleaving activity and protein-decomposition activity. Preferably, the acid-fast bacterium is preparatorily treated with an enzymatic agent having protein-decomposition activity and then with an enzymatic agent having lipid-cleaving activity. The enzymatic agent having lipid-cleaving activity is preferably a lipase and the enzymatic agent having protein-decomposition activity is preferably one or more agents selected from trypsin, pronase, chymotrypsin, plasmin and subtilisin.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁(JP)

# (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-304869

(43) 公開日 平成10年(1998)11月17日

(51) Int. C1.<sup>6</sup>

C 1 2 N 1/06  
C 0 7 H 21/00  
C 1 2 N 15/09

識別記号

F I

C 1 2 N 1/06  
C 0 7 H 21/00  
C 1 2 N 15/09

A

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-117161

(71) 出願人 000175892

三光純薬株式会社

東京都千代田区岩本町1-10-6

(22) 出願日 平成9年(1997)5月7日

(72) 発明者 薄井 貢

千葉県我孫子市寿2-9-20 ライオンズマ  
ンション我孫子寿206号

(72) 発明者 波木井 千雅子

神奈川県横浜市保土ヶ谷区法泉 2-26-  
23-111

(72) 発明者 金島 才仁

茨城県取手市取手2-18-30 ルックハイ  
ツ取手第2307号

(74) 代理人 弁理士 石原 詔二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸菌の細胞溶解方法及び核酸の抽出方法

(57) 【要約】

【目的】 有機溶剤処理や超音波処理による細胞破碎を行わずに、脂質分解酵素を用いることにより抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を可溶化させて細胞を容易に溶解することができる抗酸菌の細胞溶解方法並びにこの方法を用いて高い回収率で、しかも簡便、迅速、安全に核酸を抽出することができる核酸の抽出方法を提供する。

【構成】 抗酸菌に脂質分解活性及び蛋白質分解活性を含む酵素剤を作用させることにより、抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を分解させ、細胞を溶解することを特徴とする抗酸菌の細胞溶解方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗酸菌に脂質分解活性及び蛋白質分解活性を含む酵素剤を作用させることにより、抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を分解させ、細胞を溶解することを特徴とする抗酸菌の細胞溶解方法。

【請求項2】 抗酸菌を予め蛋白質分解活性を含む酵素剤で処理した後、脂質分解活性を含む酵素剤を作用させることにより抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を分解させ、細胞を溶解することを特徴とする抗酸菌の細胞溶解方法。

【請求項3】 脂質分解活性を含む酵素剤として、リバーゼを用いることを特徴とする請求項1又は2記載の抗酸菌の細胞溶解方法。

【請求項4】 蛋白質分解活性を含む酵素剤として、トリプシン、プロナーゼ、キモトリプシン、プラスミン及びズブチリシンからなる群から選ばれた1又は2以上の酵素剤を用いることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の抗酸菌の細胞溶解方法。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項記載の抗酸菌の細胞溶解方法を用いて核酸を抽出することを特徴とする核酸の抽出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は培養した抗酸菌や血液、尿、髄液、痰、精液、細胞、組織、生検標本に存在する抗酸菌の細胞を簡単にかつ効率よく溶解する細胞溶解方法並びに当該細胞溶解方法を用いて抗酸菌から核酸を効率よく抽出する核酸の抽出方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、核酸プローブや遺伝子増幅法を用いた抗酸菌の研究や診断が急速に進歩し、抗酸菌からの核酸抽出がますます重要になってきた。しかし、抗酸菌が他の微生物に比べて細胞に脂質を多く含むことから、従来の核酸抽出方法では細胞を十分に溶解することができないため、高い回収率で核酸を抽出することが出来なかつた。

【0003】 核酸の抽出を行なうには通常基本的に4つの操作を行う必要がある。すなわち、①細胞の溶解、②除蛋白と脱炭水化物、③分離濃縮、④洗浄精製の4つの操作である。①細胞の溶解にはリゾチーム、アクロモベブチダーゼなどの細胞壁溶解酵素やプロテインナーゼK等の蛋白分解酵素を用いたり、アルカリやSDS等の界面活性剤を用いて細胞を破壊する。

【0004】 また結核菌やぶどう球菌等強固な細胞壁を持つ微生物の場合、ビーズや超音波を用いて物理的に破壊せたりする。場合によってはこれに併用して細胞壁溶解酵素や蛋白分解酵素を作用させたり、アルカリや界面活性剤添加を組合せて行う。

【0005】 ②の除蛋白と脱炭水化物については従来よ

りフェノール・クロロホルム法による抽出が最も多く使用されている。しかしこのフェノール・クロロホルム法は毒性が強いえ時間と手間がかかるため大変扱いにくいという問題があった。そこで、本願出願人は生物材料から核酸を溶出するための前処理を行ったのち、この前処理した生物材料にチキソトロピック増粘剤を含む非親水性の高比重有機液体と水性液体を加えて混合し、遠心分離後、上層と下層の境界面に非流動性の凝集層を形成し、上層の核酸を分離抽出するようにした核酸の抽出方法、即ち相分配抽出法を提案し、特許を得ている（特許第2548494号）。

【0006】 ②の後に③分離濃縮操作においては、核酸を含む水性液体から100%のイソプロピルアルコール又は100%のエタノール等で核酸（DNAまたはRNA）を沈殿させて分離濃縮するが、従来の分離濃縮操作では、核酸を含む水性液体の塩濃度が高いため、この段階でイソプロピルアルコール（終濃度が50%）又はエタノール（終濃度が70%）等を加えても、核酸の沈殿物が無色透明であるため確認できず、この段階で核酸沈殿物を捨ててしまうことがあり、十分に核酸を回収することができなかつた。

【0007】 核酸の抽出効率と抽出の正確度は、第一に、この分離濃縮操作時の核酸と共沈剤をいかにもれなく回収するかに起因する。そこで、本願出願人は、イソプロピルアルコールやエタノール等によるアルコール沈殿による核酸を含む水性液体からの核酸の分離濃縮操作の過程において、核酸と親和性を有し、逆転写反応と競合せず、PCR反応を阻害しないで、テクニカルエラーを最小限に抑えるべく、白い沈殿物または青い沈殿物として目視を可能にすると同時に核酸の回収率を確実にする共沈剤及びその共沈剤を用いた核酸の抽出方法についても既に提案した（国際公開番号第W097/07207号）。

【0008】 ④洗浄精製においては、通常70%エタノールを用いて、分離濃縮された核酸から不純物を取り除き精製する。

【0009】 特に、抗酸菌から核酸を抽出するためには、その細胞壁の溶解を目的に軽質石油などの有機溶剤処理による脂質除去やリゾチーム等の細胞溶解酵素を用いた方法、又は煮沸処理等があるが、いずれの方法でも抗酸菌の細胞を完全に溶解することができないため、時間がかかり、核酸の回収率も低かった。また、超音波発生機を用いた超音波処理による細胞破碎では、抽出した核酸の分解と実施者への飛沫感染等の問題があつた。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記した従来の抗酸菌の細胞溶解処理における問題点に鑑みて発明されたもので、有機溶剤処理や超音波処理による細胞破碎を行わずに、脂質分解酵素を用いることにより抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を可溶化させて細胞を容易に溶

解することができる抗酸菌の細胞溶解方法並びにこの方法を用いて高い回収率で、しかも簡便、迅速、安全に核酸を抽出することができる核酸の抽出方法を提供することを目的とするものである。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明の抗酸菌の細胞溶解方法の第1の態様は、抗酸菌に脂質分解活性及び蛋白質分解活性を含む酵素剤を作用させることにより、抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を分解させ、細胞を溶解することを特徴とする。

【0012】本発明の抗酸菌の細胞溶解方法の第2の態様は、抗酸菌を予め蛋白質分解活性を含む酵素剤で処理した後、脂質分解活性を含む酵素剤を作用させることにより抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を分解させ、細胞を溶解することを特徴とする。

【0013】本発明の構成をさらに具体的にいえば、脂質分解活性を含む酵素剤としてはリバーゼを使用して抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を可溶化し、細胞を溶解する方法である。この方法によれば、抗酸菌の細胞を効率よく溶解することができ、したがって抗酸菌からの核酸抽出を容易に行なうことが可能となる。

【0014】本発明の最も好適な態様は、リバーゼの作用を増強するために、抗酸菌を予めトリプシンやプロナーゼ等の蛋白分解活性を含む酵素剤で処理し、抗酸菌自身が保有するリバーゼの作用を阻害するリバーゼインヒビターの活性を阻害または失活させたのち、リバーゼを使用して抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を可溶化し、細胞を溶解する方法である。この方法によれば、抗酸菌の細胞をさらに効率よく溶解することができ、したがって、抗酸菌からの核酸抽出を容易に行なうことが可能となる。

【0015】本発明の抗酸菌の細胞溶解方法は、好ましくは、抗酸菌からの核酸の抽出操作の前の段階、すなわち抗酸菌の細胞を溶解する操作において、脂質分解活性及び蛋白質分解活性を含む酵素剤、もしくは予め蛋白質分解活性を含む酵素剤で処理した後、脂質分解活性を含む酵素剤を、培養した抗酸菌や抗酸菌が存在する血液、尿、髄液、痰、精液、細胞、組織、生検標本等の生物材料に添加することによって行なわれる。

【0016】本発明において使用する脂質分解活性及び蛋白質分解活性を含む酵素剤としては、リバーゼA〔天野製薬(株)〕、リバーゼM〔天野製薬(株)〕、リバーゼF〔天野製薬(株)〕、リバーゼAY〔天野製薬(株)〕、リバーゼPS〔天野製薬(株)〕、リバーゼF-AP15〔天野製薬(株)〕を使用することができる。培養した抗酸菌や抗酸菌が存在する生物材料を予め0.1%～10.0% (W/V) の範囲の濃度の陰イオン性界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤等を含む緩衝液 (pH 5～9) 中で前処理したのち、上記した酵素剤を1単位/ml～1000000単位/ml、好ましくは

100単位/ml～10000単位/mlの濃度で使用するのが好適である。

【0017】脂質分解活性を含む酵素剤を用いる場合は、培養した抗酸菌や抗酸菌が存在する生物材料を予め0.1%～10.0% (W/V) の範囲の陰イオン性界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤等を含む緩衝液 (pH 5～9) 中で前処理したのち、1単位/ml～1000000単位/ml、好ましくは100単位/ml～10000単位/mlの濃度の脂質分解酵素で処理するのが好適である。

【0018】最も好適には、上記した脂質分解活性を含む酵素剤を加える前に、培養した抗酸菌や抗酸菌が存在する生物材料に0.1mg/ml～1000mg/mlの濃度の蛋白質分解活性を含む酵素剤の1又は2以上で処理したのち、1単位/ml～1000000単位/ml、好ましくは100単位/ml～10000単位/mlの濃度の脂質分解活性を含む酵素剤で処理する。

【0019】本発明の核酸の抽出方法は、上記した抗酸菌の細胞溶解方法を細胞の溶解操作に適用するものである。この細胞溶解方法により抗酸菌の細胞壁に存在する脂質を可溶化したのち、抗酸菌から核酸を抽出するためには、キレート剤を含む緩衝液 (pH 5～9) 中で前処理したのち、細胞膜または細胞壁等を破壊するために通常は約0.1%～20.0% (W/V) の範囲の濃度の陰イオン性界面活性剤や非イオン性界面活性剤等の膜溶解剤と約1M～5Mのグアニジンチオシネートまたは約1M～5Mの塩酸グアニジン等の蛋白変性剤で処理する。場合によっては、細胞膜や細胞壁等を破壊するための酵素によって処理してもよい。

【0020】上記した細胞膜や細胞壁等を破壊するための酵素として好適に用いられるものは、約1mg/mlから50mg/mlの濃度のリゾチーム、アクロモベブチダーゼ、リゾスタフイン、リチカーゼ、ムタノリシン等の膜溶解剤、もしくは約10μg/mlから20mg/mlの濃度の蛋白変性剤、たとえばプロテアーゼk、プロナーゼ、ペプシン、パパイン等がある。

【0021】上記したような前処理を行うと、抗酸菌や抗酸菌が存在する生物材料は上記したキレート剤、膜溶解剤、蛋白変性剤等を含む水溶液に溶解し、この水溶液中には核酸と各種の生物物質が可溶化する。次に、抗酸菌の核酸と各種の生物物質が可溶化しているこの水溶液から、核酸を抽出するためには、フェノール/クロロホルム抽出やチキソトロピック増粘剤を用いる相分配抽出法(特許第2548494号)、又はガラス等のシリカ表面上への固相吸着等の方法を適用することができる。また、分離濃縮操作時において前記した共沈剤を用いる方法(国際公開番号第W097/07207号)を適用することもできる。

【0022】本発明でいう抗酸菌としては、マイコバクテリウム・アフリカ、マイコバクテリウム・アビウム、

マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム、マイコバクテリウム・アビウム亜種バラツベルクロシス、マイコバクテリウム・アビウム亜種シルバティカム、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・ケローネ、マイコバクテリウム・クキイイ、マイコバクテリウム・フラベッセンス、マイコバクテリウム・フォーチュイタム、マイコバクテリウム・フォーチュイタム亜種アセタミドリチカム、マイコバクテリウム・ガストリ、マイコバクテリウム・ゴルドネ、マイコバクテリウム・ヘモフィルム、マイコバクテリウム・イントラセルラー、マイコバクテリウム・カンサシイ、マイコバクテリウム・レブレ(癪菌)、マイコバクテリウム・レブレムリウム(鼠痘菌)、マイコバクテリウム・マルモエンセ、マイコバクテリウム・マリナム、マイコバクテリウム・ミクロティ、マイコバクテリウム・モリオカエンセ、マイコバクテリウム・ノンクロモジエニカム、マイコバクテリウム・フレイ(チモテ菌)、マイコバクテリウム・ポリフェレ、マイコバクテリウム・スクロフラセウム、マイコバクテリウム・シミエ、マイコバクテリウム・スメグマチス(スメグマ菌)、マイコバクテリウム・シュルガイ、マイコバクテリウム・テラエ、マイコバクテリウム・トリビアーレ、マイコバクテリウム・ツベルクロシス(結核菌)、マイコバクテリウム・ウルセランス、マイコバクテリウム・バッカエ、マイコバクテリウム・ゼノピから選ばれる。

【0023】本発明で用いられる脂質分解活性を含む酵素剤としては、グリセロールエステルを加水分解し、脂肪酸を遊離する酵素、ブリペーゼ、リポプロテインリパーゼ、ヘパティックリパーゼ、ホルモンセンシティブリパーゼ、モノグリセリドリパーゼ、トリアシルグリセロールリパーゼ等のリパーゼやリパーゼ活性を持つエステラーゼ等を指す。

【0024】本発明で用いられる蛋白分解活性を含む酵素剤としては、プロテアーゼ、プロナーゼ、トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、ズブチリシン、ナガーゼ等がある。

【0025】脂質分解活性を含む酵素剤と蛋白分解活性を含む酵素剤を溶解する適当な水溶液には、0.1%~10.0% (W/V) の範囲の濃度の陰イオン性界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤等を含む蒸留水、または、T·E buffer(一般的には50mMのトリスヒドロキシメチルアミノエタン-1-塩酸緩衝液pH8.0~20mMのEDTA)等の緩衝液や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸ナトリウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機塩およびその混合物があり、通常、約0.1M~10.0Mの範囲の濃度で使用する。

【0026】上記した陰イオン性界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、

リン酸ラウリル、カプリレート塩、コレート塩、スルフォン酸デカン塩、デオキシコレート塩、グリココレート塩、グリコデオキシコレート塩、タウロコレート塩、タウロデオキシコレート塩等がある。

【0027】上記した適切な非イオン性界面活性剤には、Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 80, Span 85等のd-ソルビトールの脂肪酸エステル類、Tween 20, Tween 21, Tween 40, Tween 60, Tween 65, Tween 80, Tween 81, Tween 85等のポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル類、 Triton X-100等のポリオキシエチレングリコールp-t-オクチルフェニルエーテル類等がある。

#### 【0028】

【実施例】以下に、本発明の実施例を挙げて説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されるものでないことは勿論である。

#### 【0029】実施例1

小川培地にて2週間培養したマイコバクテリウム・アビウムを4.0mlのTE緩衝液(10mMのEDTA、25mMのトリス-塩酸:pH8.0)に懸濁し、クレット吸収試験管に $1.0 \times 10^9$  cells/mlとなるように調製して被験菌液とした。この被験菌液に0.2%のTritonX-100を含む同緩衝液で調製した10mg/mlのリバーゼM〔天野製薬(株)製〕を0.5ml加え、50℃、60分間反応させた後、0.5mlの5Mのグアニジンチオシネット、5%のラウロイル・サルコシン・ナトリウム、25mMのクエン酸ナトリウムの溶液を加えて60℃、60分間の処理を行い、クレット光電光度計(富士工業株式会社製)を使って濁度を測定し、表1に示した。

【0030】対照には、リバーゼM〔天野製薬(株)製〕を含まない同緩衝液を用いて同様の方法で実験した。結果は、リバーゼM〔天野製薬(株)製〕を作用させた実施例1の方が対照に比べて濁度が低かった。細胞が溶解することによって溶液の透明度が増し、濁度は低下する。即ち、濁度が低い程細胞溶解が進んでいることを示す。実施例1の濁度の数値は細胞溶解が充分に行われたことを示している。

#### 【0031】比較例1

上記実施例1と比較するために、リバーゼM〔天野製薬(株)〕の代わりにブタ脾リパーゼを用いて同様の方法で実験した。また、対照には、リバーゼM〔天野製薬(株)〕を含まない同緩衝液を用いて同様の方法で実験した。結果を表1に示した。比較例1の場合、対照に比較して濁度が多少低下しているが、実施例1に比較すればはるかに高い濁度であり、細胞溶解が多少あったにしても充分に行われたとはいえない。

#### 【0032】

【表1】

## 抗酸菌の細胞溶解

	濃度(クレット単位)	
	酵素添加	対照
実施例1	51	90
比較例1	83	90

## 【0033】実施例2

小川培地にて2週間培養したマイコバクテリウム・イントラセルラーを滅菌生理食塩水等で $1 \cdot 2 \times 10^9$  cells/ $\text{ml}$ に調製し被験菌液とした。この被験菌液 $1\text{ml}$ をマイクロチューブ( $1 \cdot 5\text{ml} \sim 2 \cdot 0\text{ml}$ )に移し、1200回転、5分間の遠心分離で上清を除去して、菌体を $500\mu\text{l}$ の $5\text{mM}$ のグルコース、 $1\text{mM}$ のEDTA(pH 8.0)、 $25\text{mM}$ のトリス一塩酸(pH 8.0)の緩衝液に懸濁し、5分間室温に放置した。放置後、 $50\text{mg}/\text{ml}$ の濃度のプロテアーゼで $37^\circ\text{C}$ 、60分間の処理を行ったのち、12000回転、5分間の遠心分離で上清を除去した。

【0034】続いて、 $400\mu\text{l}$ の $0 \cdot 2\%$ のTritonX-100を含む上記の緩衝液で再懸濁し、 $50\mu\text{l}$ の $1000$ 単位/ $\text{ml}$ のリボプロテインリバーゼと $50\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度のリゾチームを加え、 $37^\circ\text{C}$ 、60分間の処理を行い細胞壁を溶解した。

【0035】次に、細胞膜と蛋白質を変性させるために $5\text{M}$ のグアニジンチオシネット、 $5\%$ のラウロイル・サルコシン・ナトリウム、 $25\text{mM}$ のクエン酸ナトリウムの溶液を $100\mu\text{l}$ 加えて $60^\circ\text{C}$ 、60分間の処理を行ったのち、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール( $25:24:1$ , V/V)  $600\mu\text{l}$ 加え激しく振とうした後、12000回転で15分間遠心分離する。

【0036】核酸は水性液体層(上層)に、変性蛋白質は水性液体層と有機液体層(下層)との中間層に綿状の白い層をつくるので、その白い層を吸い込まないようにDNA層を注意深く口の広いピベットを用いて静かに吸い取り、新しいマイクロチューブに移した。 $600\mu\text{l}$ の冷イソプロピルアルコールを加えよく混合した後、12000回転で15分間遠心して核酸を沈殿させ上清を除去した後、ペレットに $1\text{ml}$ の $70\%$ のエタノールを加え12000回転で5分間遠心して上清を除去した。

【0037】この $70\%$ のエタノールによる核酸の沈殿操作を2回行ったのち、沈殿を乾燥させ、 $0 \cdot 1 \times \text{SSC}$ を加えて核酸を溶解した。このときに抽出・精製した核酸の回収率と純度は分光光度計(HITACHIU-3200 Spectrophotometer)を使って、波長 $260\text{nm}$ の吸光度を測

定してDNA量を計算( $\text{OD}_{260} 1 \cdot 0$ のとき、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNA量に相当する)して回収率を求めた。

【0038】また純度試験として波長 $280\text{nm}$ と波長 $234\text{nm}$ の吸光度を測定し、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ の比率が $1 \cdot 65 \sim 1 \cdot 85$ の範囲にあれば蛋白質等の混在はほとんどないものと判定し、 $\text{OD}_{234}/\text{OD}_{260}$ の比率が $0 \cdot 9$ 以下であれば多糖類等の混在は少ないものと判定した。この時抽出・精製した核酸の回収率と純度の測定結果を表2に示した。表2から明らかのように、実施例2の回収率は比較例2の軽質石油を用いた方法に比べて約3倍となり極めて優れており、また純度においてもほぼ同等といえるものであった。

## 【0039】比較例2

上記実施例2と比較するために、以下に記した従来公知の軽質石油を用いた方法で実験した。

【0040】小川培地にて2週間培養したマイコバクテリウム・イントラセルラーを滅菌生理食塩水等で $1 \cdot 2 \times 10^9$  cells/ $\text{ml}$ に調製し被験菌液とした。この被験菌液 $1\text{ml}$ をマイクロチューブ( $1 \cdot 5\text{ml} \sim 2 \cdot 0\text{ml}$ )に移し、12000回転、5分間の遠心分離で上清を除去したのち、菌体を $500\mu\text{l}$ の軽質石油：クロロホルム：緩衝液(3:1:1)に懸濁し、ボルテックスミキサーを用いて15分間懸濁した。懸濁後、 $1\text{ml}$ の緩衝液を加えよく混和させたのち、12000回転、5分間の遠心分離で上清を除去した。

【0041】次いで、 $10\text{mg}/\text{ml}$ のナガーゼを加えて $37^\circ\text{C}$ 、4時間の処理を行ったのち、 $50\text{mg}/\text{ml}$ のリゾチームを加えて $50^\circ\text{C}$ 、4時間の処理を行った。

【0042】次に、 $1\%$ のラウリル硫酸ナトリウムと $3\text{mg}/\text{ml}$ のプロナーゼを加えて $37^\circ\text{C}$ 、12時間の処理を行ったのち、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール( $25:24:1$ , V/V)  $600\mu\text{l}$ 加え激しく振とうした後、12000回転で15分間遠心分離する。核酸は水性液体層(上層)に、変性蛋白質は水性液体層と有機液体層(下層)との中間層に綿状の白い層をつくるので、その白い層を吸い込まないようにDNA層を注意深く口の広いピベットを用いて静かに吸い取り、新しいマイクロチューブに移した。

【0043】 $600\mu\text{l}$ の冷イソプロピルアルコールを

加えよく混合した後、12000回転で15分間遠心して核酸を沈殿させ上清を除去した後、ペレットに1mlの70%のエタノールを加え12000回転で5分間遠心して上清を除去した。この70%のエタノールによる核酸の沈殿操作を2回行ったのち、沈殿を乾燥させ、0.\*

\* 1×SSCを加えて核酸を溶解した。この時抽出・精製した核酸の回収率と純度を実施例2と同様に測定し、表2に示した。

#### 【0044】

【表2】

#### 抗酸菌からの核酸抽出

	回収率(μg)	純度(A <sub>260/280</sub> )	純度(A <sub>260/280</sub> )
実施例2	32	0.64	2.03
比較例2	11	0.97	1.61

#### 【0045】実施例3

小川培地にて2週間培養したマイコバクテリウム・アビウムを滅菌生理食塩水等で $6.4 \times 10^8$  cells/mlに調製し被験菌液とした。この被験菌液1mlをマイクロチューブ(1.5ml~2.0ml)に移し、12000回転、5分間の遠心分離で上清を除去して、菌体を500μlの100mMのEDTA(pH8.0)、50mMのトリス-塩酸(pH8.0)の緩衝液に懸濁し、5分間室温に放置した。放置後、50mg/mlの濃度のトリプシンで37℃、60分間の処理を行ったのち、12000回転、5分間の遠心分離で上清を除去した。

【0046】続いて、400μlの0.2%のTween-20を含む上記の緩衝液で再懸濁し、50μlの10000単位/mlのリバーゼと50μlの1mg/mlの濃度のリゾチームを加え、45℃、30分間の処理を行い、細胞壁を溶解した。

【0047】次に、細胞膜と蛋白質を変性させるために5Mのグアニジンチオシネート、10%のラウロイル・サルコシン・ナトリウム、25mMのクエン酸ナトリウムの溶液を100μl加えて60℃、60分間の処理を行ったのち、2.7%(W/V)のBENTONE SD-3を含むクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1, V/V)600μlを加え激しく振とうした後、12000回転で15分間遠心分離した。

【0048】遠心分離後、上層(水性液体層)と下層(高比重有機液体層)の境界面に非流動凝集層が形成されるので、マイクロチューブを傾斜(デカンテーション)させて上層のDNAを含む水性液体層を新しいマイクロチューブに移した。

【0049】水性液体層の1/10量に相当する量の3Mの酢酸ナトリウムを加え、さらに同量のイソプロピルアルコールを加え軽く攪拌した後、12000回転で15分間遠心して核酸を沈殿させ、デカンテーションで静かに上清を除去した後、ペレットに70%のエタノール1mlを静かに加え12000回転で5分間遠心してデカンテーションで静かに上清を除去し、乾燥させた後、

0.1×SSCを加えて核酸を溶解した。

【0050】この時抽出・精製した核酸の回収率と純度を実施例2と同様に測定し、表3に示した。この時抽出・精製した核酸の回収率と純度は、表3から明らかのように比較例3の煮沸・超音波法を用いた方法と同等の成績であった。

#### 【0051】比較例3

上記実施例3と比較するために、以下に記した従来公知の煮沸・超音波法を用いた方法で実験した。

【0052】小川培地にて2週間培養したマイコバクテリウム・アビウムを滅菌生理食塩水等で $6.4 \times 10^8$  cells/mlに調製し被験菌液とした。この被験菌液1mlをマイクロチューブ(1.5ml~2.0ml)に移し、100℃で10分間煮沸したのち、40μgのプロテイネースKと0.5%のTween-20、及びガラスピーブを加え、37℃、30分間の処理を行った。

【0053】続いて、60℃で20分間の超音波処理を行ったのち、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1, V/V)600μlを加え激しく振とうした後、12000回転で15分間遠心分離する。核酸は水性液体層(上層)に、変性蛋白質は水性液体層と有機液体層(下層)との中間層に綿状の白い層をつくるので、その白い層を吸い込まないようにDNA層を注意深く口の広いピペットを用いて静かに吸い取り、新しいマイクロチューブに移した。

【0054】600μlの冷イソプロピルアルコールを加えよく混合した後、12000回転で15分間遠心して核酸を沈殿させ上清を除去した後、ペレットに1mlの70%のエタノールを加え12000回転で5分間遠心して上清を除去した。この70%のエタノールによる核酸の沈殿操作を2回行ったのち、沈殿を乾燥させ、0.1×SSCを加えて核酸を溶解した。この時抽出・精製した核酸の回収率と純度を実施例2と同様に測定し、表3に示した。

#### 【0055】

【表3】

## 抗酸菌からの核酸抽出

	回収率 ( $\mu\text{g}$ )	純度 ( $A_{264}/A_{280}$ )	純度 ( $A_{260}/A_{280}$ )
実施例3	21	0. 64	2. 01
比較例3	21	0. 97	1. 89

【0056】

【発明の効果】以上述べたように、本発明によれば、回  
10 収率の低い有機溶剤処理を用いた方法や実験者への感染  
の懼がある超音波処理による細胞破碎を行わずに、脂\*

\*質分解酵素を有効に用いることにより抗酸菌の細胞壁に  
存在する脂質を可溶化させて細胞を容易に溶解し、高い  
回収率で、しかも簡便・迅速・安全に核酸を抽出する  
いう大きな効果が達成される。

フロントページの続き

(72)発明者 浅井 義征

埼玉県与野市上落合神明494-4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**